

PCT National Publication Gazette

National Patent Publication No. 7-506258  
Date of National Publication: July 13, 1995  
International Class(es): C12M 1/00  
1/34  
C12Q 1/68 ( 15 pages in all)

---

Title of the Invention: Polynucleotide Amplification Analysis  
Employing Microprocessing Device  
Patent Appln. No. 5-519517  
Filing Date: April 29, 1993  
Date of Filing Translation: October 28, 1994  
International Filing No. PCT/US93/04039  
International Publication No. WO93/22058  
International Publication Date: November 11, 1993  
Priority Claimed: Country: U.S.A.  
Filing Date: May 1, 1992  
Serial Nos. 877,536 & 877,661  
877,662 & 877,701  
877,702  
Inventor(s): Wilding, Peter  
Clicca, Larry J.  
Applicant(s): Trustees of the University of  
Pennsylvania

(transliterated, therefore the  
spelling might be incorrect)

| (51) Int. Cl. <sup>8</sup> | 識別記号 | 庁内整理番号     | F I |
|----------------------------|------|------------|-----|
| C 1 2 M 1/00               |      | A 9050-4 B |     |
| 1/34                       |      | Z 7229-4 B |     |
| C 1 2 Q 1/68               |      | Z 9453-4 B |     |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 15 頁)

|               |                  |
|---------------|------------------|
| (21) 出願番号     | 特願平5-519517      |
| (86) (22) 出願日 | 平成5年(1993)4月29日  |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成6年(1994)10月28日 |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US93/04039   |
| (87) 国際公開番号   | WO93/22058       |
| (87) 国際公開日    | 平成5年(1993)11月11日 |
| (31) 優先権主張番号  | 877, 536         |
| (32) 優先日      | 1992年5月1日        |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)          |
| (31) 優先権主張番号  | 877, 661         |
| (32) 優先日      | 1992年5月1日        |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)          |

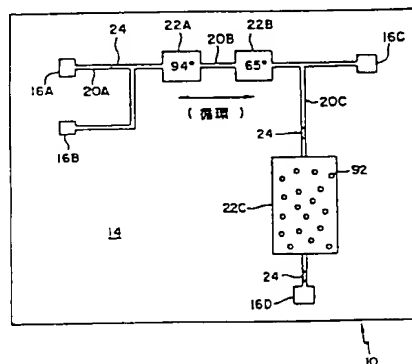
- (71) 出願人 トラスティーズ・オブ・ザ・ユニバーシ  
ティ・オブ・ペンシルベニア  
アメリカ合衆国19104ペンシルベニア州、  
フィラデルフィア、スイート300、マーケ  
ット・ストリート3700番
- (72) 発明者 ワイルディング、ピーター  
アメリカ合衆国19301ペンシルベニア州、  
パオリ、ダービー・ロード208番
- (72) 発明者 クリッカ、ラリー・ジェイ  
アメリカ合衆国19312ペンシルベニア州、  
パーウィン、ネイサン・ヘイル・ロード  
886番
- (74) 代理人 弁理士 青山 茂 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微細加工装置を用いたポリヌクレオチド増幅分析

## (57) 【要約】

ポリヌクレオチド重合反応を行うことにより試料中の  
予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるための装  
置を開示する。該装置は、試料流入ポート(16A)および  
流入ポート(16A)より伸びるメソスケール流動システ  
ムを形成するよう微細加工された基材よりなる。該メソ  
スケール流動システム(20)は、流入ポートと流体連絡  
したポリヌクレオチド重合反応チャンバー(22)を含  
有し、該チャンバーには予め選択されたポリヌクレオチ  
ドの重合および増幅に要する試薬が配されている。一の  
具体例において、該装置を利用して、該反応チャンバ  
(PCRチャンバー)中でポリメラーゼ連鎖反応(PCR)  
を行うことができる。該PCRチャンバー(22)には、  
ポリメラーゼ連鎖反応に要する試料ポリヌクレオチド、ポ  
リメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、プライマーおよび  
他の試薬が配されており、該装置には、反応チャンバ  
の内容物の温度を、二本鎖ポリヌクレオチドを脱ハイブ  
リダイズさせる温度、プライマーをアニーリングさせる  
温度、およびポリヌクレオチドを重合し増幅させる温度  
に熱コントロールするための手段が配されている。



## 請求の範囲

1. ポリヌクレオチド重合反応を行うことにより、試料中の予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるための装置であって：

試料投入ポートと；

該投入ポートから伸びる試料流動チャンネル；および

該流動チャンネルと液体連絡し、重合反応用の試薬を含有するポリヌクレオチド重合反応チャンパー；よりなるメソスケール流動システム；

とを形成するよう無細加工された固体基材；ならびに

該チャンパーの内容物を無調整し、温度をコントロールして該予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるための手段よりなる該装置；

2. 該重合反応がポリメラーゼ連鎖反応(PCR)であって、該PCRチャンパーが：該予め選択されたポリヌクレオチド、ポリメラーゼ、ヌクレオチド三リン酸、該試料ポリヌクレオチドとハイブリダイズする第一のプライマー、および該ポリヌクレオチドに相補的な配列とハイブリダイズする第二のプライマーよりなり、該第一のプライマーおよび第二のプライマーが重合反応のポリヌクレオチド生成物の形成を形成し；および

無調整するための該手段が、二本鎖ポリヌクレオチドを一本鎖のポリヌクレオチドに分離し、該プライマーを一本鎖ポリヌクレオチドの相補領域にアニーリングするようコントロールされた温度と、該プライマーの間にポリヌクレオチドを合成するようコントロールされた温度との間に、該チャンパーの内容物を、無調整して該予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるための手段よりなる該装置；1記載の装置。

3. 該PCRチャンパーが：

二本鎖ポリヌクレオチドを分離する温度の第一のセクション；

該プライマーを一本鎖ポリヌクレオチドの相補領域にアニーリングする温度の第二のセクション；

パーと液体連絡した該基材中に配されたメソスケール排出領域よりなり；および該装置が

さらに、該反応チャンパーを通過して、該増幅されたポリヌクレオチドを該排出領域に輸送する流動を誘起させるための手段を含有する該装置；10記載の装置。

13. 該排出領域が、該増幅されたポリヌクレオチドに輸送可能に結合しうるポリヌクレオチド・プローブを含有する該装置；12記載の装置。

14. 該ポリヌクレオチド・プローブが、絶縁ビーズ上に固定化されている該装置；13記載の装置。

15. 該排出領域が、複数の第二の流動チャンネルに通じる分岐部よりなる、該流動チャンネルに液体連絡したマイクロスケール領域よりなる該装置；14記載の装置。

16. 該試料が細胞試料であって、該装置が、さらに：該メソスケール流動システム中の該反応チャンパーに液体連絡し、細胞試料を溶解するための細胞溶解手段；および

該細胞溶解手段、次いで、該反応チャンパーへの該試料の流動を誘起するための手段よりなる該装置；1記載の装置。

17. さらに、：該細胞溶解手段から上流にあって、該細胞試料に結合しうる糖基配位よりなる、予め選択された細胞試料を選択的に溶解するための細胞溶解領域；および

該分離領域内において；

最初は、該試料からの該細胞試料を分離するための該糖基配位によって、該試料中の該細胞試料を溶解するのに十分に速い速度；次いで、

二番目に、該分離された細胞試料を該分離領域から該細胞溶解領域へ輸送させるのに十分に速い速度にて流動を誘起するための手段よりなる該装置；16記載の装置。

18. 該固体基材が、無細加工されたシリコンよりなる該装置；1記載の装置。

19. さらに、該基材と組み合わせて用いるための該装置よりなり、該装置が：

該基材を保持するための手段；および

該第一のセクションおよび第二のセクションの間に配された流動よりなり；

ここに、該装置が、

該チャンパーの内容物を、少なくとも該第一のセクションおよび第二のセクションの間に送り通し結して、該ポリヌクレオチドの複数の増幅産物を行うための手段を含有する該装置；2記載の装置。

4. 該第一のセクションが二本鎖ポリヌクレオチドを分離する温度にコントロールされ；かつ、

該第二のセクションおよび該流動が該第一のセクションから離れて位置し、それにより、該第一のセクションから該第二のセクションへの該チャンパーの内容物の輸送の間に、プライマーを一本鎖ポリヌクレオチドにアニーリングするのに十分な温度まで試料が受動的に冷却される該装置；3記載の装置。

5. さらに、該第一のセクションおよび第二のセクションをそれぞれに熱コントロールするための手段よりなる該装置；3記載の装置。

6. さらに、該第一のセクションを熱コントロールするための手段よりなる該装置；4記載の装置。

7. 該熱コントロールするための手段が、電気抵抗手段よりなる該装置；5または6記載の装置。

8. 該熱コントロールするための手段が、該PCRチャンパーに電熱エネルギーを供給するための手段よりなる該装置；5または6記載の装置。

9. 該装置が、さらに、該PCRチャンパーと液体連絡する第二のポートよりなる該装置；2記載の装置。

10. さらに、該増幅されたポリヌクレオチドを輸送するための手段よりなる該装置；1記載の装置。

11. 該輸送するための手段が、ポリヌクレオチド凝集により引き起こされる該流動中の凝集の流動に対する抵抗を輸送するための手段よりなる該装置；10記載の装置。

12. 該増幅されたポリヌクレオチドを輸送するための該手段が、該反応チャン

該基材上の投入ポートと接合する液体投入手段よりなる該装置；1記載の装置。

20. さらに、該液体手段に保持された場合に、該液体の流動システムを通過して液体を通過させるためのポンプ手段よりなる該装置；19記載の装置。

21. 該装置が、さらに、該装置の、および、試薬を該流動システムにデリバリーするための手段よりなる該装置；20記載の装置。

22. 該装置が、該反応チャンパーを加熱するための手段を含有する該装置；19記載の装置。

23. さらに、該試料と組み合わせて用いるための該装置よりなり、該装置が：

該試料を保持するための手段；および

該試料中の該メソスケール流動システムの内容物を観察するための光学的手段よりなる該装置；10記載の装置。

24. 該光学的手段が拡大光学装置およびビデオカメラよりなり、該装置が、さらに：

該装置の角度および位置を手動的に調整するための傾斜機構；および

該流動システムの内容物を観察するためのビデオ・スクリーンよりなる該装置；23記載の装置。

25. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことにより、試料中の予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるための装置であって：

試料投入ポートと；

該投入ポートから伸びる試料流動チャンネル；および

該流動チャンネルに液体連絡し、該予め選択されたポリヌクレオチドおよびPCR試薬を受け取るためのPCRチャンパーよりなるメソスケール流動システムとを形成するよう無細加工された固体基材；ならびに

該チャンパーの内容物を無調整させ、それにより、各々の装置において、温度をコントロールして二本鎖ポリヌクレオチドを分離させて、ポリヌクレオチドを合成し、それによって該予め選択されたポリヌクレオチドを増幅させるための手段



第二に、区分された施設集団を、該領域から該施設を相手段へ放出させるのに十分に高速度で、

は該料を該細胞分離液にデリバリーする工程を含む請求項42記載の方法。

問題出現の相互参照

本出題は以下の関連する同時係属出題：1992年5月1日出題のUSSN 07/877.702；1992年5月1日出題のUSSN 07/877.701；1992年5月1日出題のUSSN 07/877.536；および1992年5月1日出題のU.S. シリアルナンバー 07/877.661と同時に出版されておられ、これらの提示を引用して本明記号の一とみなす。

発明の背景

本発明は、一般的に、分析を行うための方法と装置に関する。より具体的に  
は、本発明はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含む分析が可能な小さく、典型的に  
は単一使用法のもジュールのデザインと構成に関する。

ここ十数年の間に、種々の診断および監視の目的のための生物学的試験の分析を行うための非常に多数のプロトコル、試験キット、およびカートリッジが当該技術により開発されてきた。免疫アッセイ、酵素アッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応に基づく分析、種々のリガンドレセプター阻害作用、そして種々な試料中の目的分子移動が全て種々の生物学的化合物もしくは生物学的存在または濃度、または特定の細胞のタイプの存在を指示するしくみに用いられてきた。

最近、生物学的試料を取り扱うため、またある種の臨床テストを行うために小さく使った機器が開発されてきた。シェラジ(Shoji)らは、シリコンエポキシの上に加工された小型の血液のガスアナライザーの使用を報告している。シェラジ(Shoji)ら、センサーズ・アンド・アクチュエーターズ(Sensors and Actuators),第15巻:第101号(1987年10月)107頁(1988年)。サトウ(Sato)らは、微小増幅加工によるシリコン装置を用いた細胞融合性を報告している。サトウ(Sato)ら、センサーズ・アンド・アクチュエーターズ(Sensors and Actuators),第21巻:第23号(1988年9月)535頁(1990年)。チバ・コーニング・バイオアナリティクス・コーポレーション(Ciba Corning

Diagnostics Corp.) USAは血液凝固を感知するマイクロプロセッサで制御されたレーザー光厚計を開発した。

動物組織化学はマイクロ電子分析から起こった。アンゲル(Angell)ら、サイエンスフィクション・アメリカナ(Scientific American)第248巻第4頁(1955年5月19日)から、動物組織化学により、最小元素を何十クロロに生物の組織の寸法)からナノメートル(1つの生物学的高分子の寸法)まで拡大させた研究結果を「最小分子化学」の概念が形成された。このスケールは本邦組織化学において「分子生物学」に与えられた。メソスケールの概念を言う部分の経験的知識は最小組織の研究、すなわち、組織の形成および流れの特性の研究を伴う。メソスケールの概念の確定的な能力は生命化学において十分に認識されてきていない。

ブルーネット(Brunette)はエスブリタントル・セル・リサーチ(Esper.Cel. Res.), 第117巻:第203頁~第217頁(1986年)および第164巻:第1頁~第2頁(1986年)は、シリコン、タランタンシリマー等の炭素における確率経路および上皮細胞の行動を研究した。マッカーニー(McCartney)ら(キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 第41巻:第3046頁~第3051頁, 1981年)は、炭素に接したプラスチックの基材中の癌細胞の行動を研究した。セル(LaCell)(ブラッド・セル(Blood Cells), 第12巻:第179頁~第189頁(1986年)は、癌細胞を培養するときにマイクロカピラリー中における白血球と赤血球の流れを研究した。フング(Hung)とワイスマン(Weissman)は癌細胞の成長したタンホムの液体力学の研究を報告したが、分析結果に関連するデータは作成していない。フング(Hung)ら(メディカル・アンド・バイオロジカル・エンジニアリング(Med. and Biol. Engineering), 第9巻:第237頁~第254頁(1971年))およびワイスマン(Weissman)ら(アトム・インスト・セル・エンジニアリング(J. Am. Inst. Chem. Eng. J.), 第17巻:第25頁~第30頁(1971年))、クロプス(Clopp)は、其実験のマルチチャンネル法は培養槽においてイオン選択型電極を分離するために、生物学的過程の重要な特徴において、2枚の電極の配置がシリコン型に修正加工した。

シートからなるサンドイッチを利用した。コロンブス(Columbus)とクリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、第3巻(第1531頁—第1537頁)(1987年)の、マサダ(Basuda)およびバシズ(Bashizu)とは細胞の特性(5才児は胎児細胞)の、ためたのは炭素ナノチューブの使用について報告している。マサダ(Basuda)ら、ブローディングス・アイミーイーイー／アイエーエス・ミーティング(Proceedings IEEE/IAS Meeting)、第1549頁—第1553頁(1987年);およびバシズ(Bashizu)ら、ブローディングス・アイミーイーイー／アイエーエス・ミーティング(Proceedings IEEE/IAS Meeting)、第1735頁—第1740頁(1988年)。本誌では生物学的試体の分析のためのメソスケールの設置の使用の必要性を十分に認識していない。

DNA断片を増殖させるためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いる方法は十分に確立されている(例えば、マニチチス(Sambrook)と、モレナール・クローニング(Molecular Cloning): ア・ラボラトリー・マニュアル(A Laboratory Manual), コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1989年、頁14.1~14.3を参照)。PCR増幅反応は新規なDNAポリメラーゼ、例えば、タカタ(Taq) DNAポリメラーゼ(チエン(Chien), ジェン・オフ・バクテリオロジー(J. Bacteriol.), 第127巻: 第1550頁(1976年))と、マクロドナミリン酸、そして特異DNAと相対する1本の鎖に結合する配列とそれらの複合体であり、増殖させるべきDNA断片に隣接する、真の配列を有するその他のオリゴヌクレオチド(プライマー)を用いて特異DNA上でなされる。反応成分は二本特異DNAのハイブリッドを導く(融解する)ための高い温度(例えば94℃)に続いてアニールし重合する低い方の温度(例えば65℃)の間を繰り返す。ハイブリッド形成、アニール及び重合の順を幾回もの反復サイクルにより特異DNAの指数関数的増殖が供給される。例えば、長さが20kbpまで1 $\mu$ mまでの特異DNAは1時間あたりの増幅率が約10<sup>4</sup>倍まで35サイクルの増幅により得られる。DNAのプライマーを用い、自動化されたPCR増幅を行うための機械が入手可能である(パーキン・エルマー・コー

ポリイン(Perkin Elmer Corp.)。

PCR増幅は遺伝的な疾患の診断に応用されてきた(エンゲル(Engelke)ら、*プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス*(*Proc. Natl. Acad. Sci.*), 第85巻:第544頁(1988年)、臨床試料の新規生物の塩基配列の検出、(オウ(Ou)ら、*サイエンス*(*Science*), 第239巻:第295頁(1988年))、臨床試料、例えば精子の遺伝的同一性(Li)ら、*ネイチャー*(*Nature*), 第335巻:第414頁(1988年)、遺伝化された遺伝子における変異の分析(ファー(Farr)ら、*プロシーディングス・オブ・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス*(*Proc. Natl. Acad. Sci.*), 第85巻:第1629頁(1988年))および分子クローニングの多くの態様において(オステ(Oste)、*バイオテクノロジー*(*BioTechniques*), 第6巻:第162頁(1988年))。PCRによる分析は、プローブとしての使用のためのクローニングした二本鎖DNAの特定の配列を生成するため、cDNAの特定の断片を選択的に増幅させることにより、クローニングされていない遺伝子に特定のプローブを生成するため、少量のmRNAからcDNAのライブラリーを調製するため、塩基配列決定のための大量の試料の調製のため、変異の分析のため、のほかに応用範囲で用いることができる。変異と、遺伝的または免疫学的疾患の試験のごとき試験で広範囲の遺伝的適用において臨床的に用いることのできる、PCR分析のための簡便で迅速なシステムが必要とされている。

本発明の一つの目的は、最少な量の試料を分析でき、非常に低い温度のポリヌクレオチドを検出でき、分析結果を迅速に出せるような迅速な反応環境を伴う分析システムを提供することにある。もう一つの目的は、一連の応用において前もって選択した塩基または無塩基試料の、迅速で自動化されたPCR分析用試料が行えるメソスケールの連続変換を要した、容易に大量生産できる、使用上の小さな(例えば体積にして1cc以下)装置を提供することにある。本発明のさらなる目的は、迅速な塩基試験、例えばウイルスまたは細菌による感染の試験、細胞培養の汚染の試験、もしくは細胞中の増殖DNAまたは遺伝子の存在の試験等の一連の迅速な塩基試験を実施するために簡便に使用できるような一時的装置

レオチドを生成するようにPCRチャンバーの内容物の温度を自動的に変化させるための手段をも含む。一つの具体例において、PCRチャンバーは、PCRのために必要な温度に自動的に温度が調節するよう一連のセクションからなるものとして構成することができる。別態として、PCRチャンバーは、ハイブリッド形成、アニーリングおよび重合のために必要とされる異なる温度に設定された二重もしくはそれ以上のセクションからなり、この場合、本装置はさらに、例えば、本明細書中で開示することく、PCRを実施するためにセクション間にチャンバーの内容物を移動させる手段、例えば、ポンプその他の手段を含む。本装置は、さらに、増幅したポリヌクレオチドを検出する手段をも含む。本装置は、マーカーとしてのある特定のポリヌクレオチドの存在を用いた、細胞中または培養中のポリヌクレオチドの存在の分析、あるいはウイルスまたは細胞のタイプの分析を含めた、増幅の自動化された、感度が高い迅速なポリヌクレオチドの分析を実施するために使用することができる。

一般に、本明細書中で開示することく、固体基材はメソスケールのフロー・システムと反応チャンバーを含むチップからなる。メソスケールのフロー・システムと反応チャンバーは精密された微小機械加工工程を用いシリコンおよび他の固体基材からデザインされ加工される。装置中のメソスケールのフロー・システムはフロー・チャンネルと一連またはそれ以上の反応チャンバーを基材の表面に機械加工し、代えてカバー、例えば透明なガラスのカバーを表面に付着させることにより組み立てることができる。本装置は、例えば、基材またはカバーを貫いて通達する孔によって形成される注入ポートを通してフロー・システムに導入される最少体積(<10μl)の試料を分析する。メソスケールのフロー・システムの寸法は、典型的には、5μmより小さいであろうし、個々のチャンネル、チャンバー、または他の機能要素の寸法は、しばしば、1μmより小さく、例えばナノリットラもしくはピコリットラの範囲であることである。非常に低い温度で存在するポリヌクレオチド(たとえばナノグラム量)が迅速に(<10分)増幅され検出される。ポリヌクレオチドの重合分析が完了した後、装置を捨てることができ、

を廃棄することにある。

#### 装置の要約

本発明は試料中のポリヌクレオチドの迅速な増幅を可能にするポリヌクレオチド重合を行うための小さく、大量生産できる、典型的には単一使用の一連の装置を提供する。一つの具体例において、本装置は、微ミニマータの厚さで約0.2ないし2.0センチメートル平方の大きさであって、試料の注入ポートとメソスケールのフロー・システムを形成するように機械加工された固体基材よりなる。本装置のフロー・システムは、注入ポートから伸びる試料のフロー・チャンネル、およびフロー・チャンネルのポリヌクレオチドと液体増幅したポリヌクレオチド重合反応チャンバーを含む。「メソスケール」という用語は本明細書中において断面の寸法が0.1μmないし500μmであり、好ましい反応チャンバーの幅が2.0ないし500μmであり、より好ましくは3ないし100μmであるようなチャンバーと形状を定義するのに用いる。多くの適用において、5ないし50μmの幅のチャンネルが有用であろう。増幅が起こる基材中のチャンネルは多少より大きい寸法、例えば1ないし5mmにすることができる。好ましい反応チャンバーおよびチャンネルの寸法は0.1ないし100μm、典型的には2ないし50μmである。本装置のフロー・チャンネルは、反応チャンバーに接しており、好ましい幅は2.0ないし200μmであり、厚さは0.1ないし100μmである。

一つの具体例において、本装置は反応チャンバー中でポリヌクレオチド(PCR)を実施するために利用することができる。反応チャンバーには、試料のポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ヌクレオシド三リン酸、試料のポリヌクレオチドとハイブリダイズ可能な一連のプライマー、試料のポリヌクレオチドに相補的な配列とハイブリダイズ可能な二重のプライマー(ここに一重目と二重目のプライマーは重合するポリヌクレオチド生成物の両末端を定義する)を含むPCRのための試薬を提供することができる。本装置は、各サイクルにおいて、温度を制御して1)二本鎖ハイブリッドを壊す(「融解する」)、2)プライマーを一本鎖DNAにアニールさせる、および3)プライマーの両端で増幅されたポリヌ

クリップは、典型的には、チップを保持するための收容部位を備え、一層またはそれ以上の試料と注入ポートが一層またはそれ以上のフロー・ラインとその中で対峙するような器具と共に用いられるであろう。ある特定のポリヌクレオチドを含むと思われる生物学的試料を基材の注入ポートに適用した後、該チップを器具内に置入してポンプ、例えば器具内のそれを試料をフロー・システムに強制的に通すために作動させる。製造として、試料は本器具によりチップ内に注入される。ポリヌクレオチドの試料に必要とされる試薬はチップへの注入の前にポリヌクレオチドの試料に添加できる。別態として、分析を完了させるために必要な試薬を別々の注入ポートから、例えば、本器具によって反応チャンバーに注入できる。液体試料と試薬は両方ともメソスケールのフロー・システムに入れることができる。

一つの具体例において、本装置はPCR分析を行うために使用でき、反応チャンバーの一層またはそれ以上のセクションの温度は、例えば、基材にある反応チャンネルの近くに一層またはそれ以上の電気抵抗加熱器を設けることにより、あるいは反応チャンバーに向けたバルスレーザまたは他の電熱エネルギー源を用いることにより制御することができる。本器具は收容部位に、チップの製造に組み込まれた検点と対峙する。例えば、反応チャンバーを加熱する電気抵抗加熱器を制御するための電気的検点を含む。反応チャンバーの温度制御において補助するために器具内には熱電素子を設けることもできる。本器具は、ハイブリッド形成と重合反応のために必要とされるPCR温度サイクルを自動的に制御するための、装置内のセンサーと接続された通常の回路要素センサーを設けることができる。

メソスケールの反応チャンバー中のポリヌクレオチド増幅反応により生成した増幅ポリヌクレオチドは基材中のポートを通じて収集することができる。例えば、該増幅ポリヌクレオチドは基材の他の方面により検出される。製造として、装置中の反応チャンバーと液体増幅したメソスケールの検出領域を、メソスケールのフロー・システムの一部として、基材中に機械加工できる。該検出領域は、増幅したポリヌクレオチドと検出可能な状態である。ラベルされたポリヌクレオチドあるいは抗体プ

ロープのごときベルされた結合部分を包含することができ、重合したポリヌクレオチド生成物の抽出領域における存在は、例えば、重合したポリヌクレオチドと結合部位との融解、抽出領域の上のガラスのカバーを過した、あるいは基材それ自体の半透明なセクションを通して光学的抽出によって抽出できる。

陽性の分析は、反応チャンバー中で重合したポリヌクレオチドの生産の際のフロー・システムの異なる地点における圧力または電気伝導度の変化のごとき試液体の流れの特性における抽出可能な変化によっても示すことができる。一つの具体例において、本装置はポリヌクレオチド増幅反応チャンバーを備えたメソスケールのフロー・システムからなり、抽出領域は、例えば、当該抽出領域の上部に設けた光学窓を通して陽性の結果を採取するような分光光度計のごとき感知装置を備えた器具と組み合わせて用いることができる。本器具は反応チャンバー、抽出領域、もしくはフロー・システムのどこか他の領域で感知される圧力の表示、伝導度等を示す電気的信号を受け取るように設計することができる。

本器具は混合物中のポリヌクレオチドの迅速な平行した抽出を可能にする複数の抽出ノ反応チャンバーからなるものとして設計することができる。本メソスケールのフロー・システムは、貴重試料中の核酸の溶解を反応チャンバーに運ばれる前に可能にするための突出部分、あるいは減少した断面積のセクションを含む。装置の中に入れたシリコンの鋭い角を持つ断片もまた溶解の手段として用いることができる。メソスケールのフロー・システムにはまた例えば、フロー・チャンネルの壁に固定化され、核酸が、核酸を溶解する溶液に、次いで反応チャンバーに運ばれる前に、液体の流れの低い速度においては不均一な核酸の集団の中のある特定のタイプの核酸を重合し、液体の流れの高い速度においては、そのタイプの核酸を抽出するような結合部位からなる核酸増幅領域を含めることができる。この具体例において、選択された核酸の対集団から核酸内DNAまたはRNAは単離され、一層の装置内でのポリヌクレオチド分析のためにメソスケールの反応チャンバーに運ばれる。

もう一つの具体例において、酸性ビーズがメソスケールのフロー・システムに設けられ、これは、例えば、器具中の外部配管にありフロー・システムにそって

動くことができる。一つの具体例において、ポリヌクレオチドのプロンプが酸性ビーズに固定化され、このことによりビーズが反応チャンバー中の増幅したポリヌクレオチドに結合することができ、固定化されたポリヌクレオチドのプロンプを含む酸性ビーズは、例えば、重合したポリヌクレオチド生成物を重合するために、分析の終わりに、フロー・システムを通し反応チャンバーに送られるであろう。結合したポリヌクレオチドは、次いで、フロー・システム中の抽出あるいは離型チャンバー、もしくは収集ポートに、酸性ビーズにのせて送ることができ、

本装置の幾つかの特徴と利点を表1に示す。本装置は両液体である溶液またはフィルムの抽出のため、もしくはある核酸のタイプの存在、もしくは核酸における塩基子または糖塩基DNAの配列の存在のための迅速な試験を提供する。本明細書中に提示される装置は全て、試料中のポリヌクレオチドを増幅するために用いられるPCRチャンバーを含むメソスケールのフロー・システムにより特徴付けられ、これにはPCRのために必要とされるポリメラーゼおよび他の試薬が供給される。本装置は広範囲の適用でポリヌクレオチドを増幅するのに使用できる。分析の終わりに、チップを一般的には捨て、

表1

| 特性            | 利点  |
|---------------|---|
| 適応性           | チップのデザインの数あるいは利用できる応用の数には制限なし。  |
| 再生性           | チップの位置で、即座にされた大量生産が可能。  |
| 低コストの生産       | 目下のシステムとの統合する評価が可能で、単一使用の工程における使い捨て可能な性質。                             |
| 小さいサイズ        | 大規模な面積利用を要さず、不便な実験室の環境での使用のために設計された、持ち運び可能なユニットに過ぎ、保管および輸送コストが最小。     |
| ミクロスケール       | 必要な試料と試薬の体積が最小で、装置のコスト、特に高価で、特別な試験方法のための試薬のコストが低減され、即座にされた器具利用の計画が可能。 |
| 感度性           | クリーンな環境を必要とする微生物学的分析および他の手法で用いるためにチップは感度可能。                           |
| 密閉されたシステム     | バイオハザードは最小限化され、工程の完全さは確実。   |
| 複数の回用が可能であること | 一層のチップで多くの工程あるいは分析が実施可能で、パレル分析が可能。                                    |
| 抽出物の複数の能力     | 事実上ほとんどのシステムに分析あるいは工程の監視の能力を拡大でき、広範囲の応用が可能。                           |
| 再利用可能なチップ     | ある種の適用のために工程あたりのコストが使用者にとって低減化可能。                                     |

## 図面の簡単な説明

図1は、基材の表面に付着した透明なカバー12を有し、その上には注入ポート16とPCR反応チャンバー22に連絡されたメソスケールのフロー・チャンネル20が形成された本発明の装置の模式的断面図である。

図2は、図1の装置の斜視図である。

図3Aは、それを示すために用いることができ、その中の反応チャンバー22の温度を制御するための加熱要素57を含む、模式的に示した器具50内に収容された分析装置10の模式図である。

図3Bは、それを示すために用いることができ、その中の反応チャンバー22の温度を制御するための加熱要素53を含む、器具50内に収容された分析装置10の模式図である。

図4は、基材の表面に付着した透明なカバー12を有し、その上には注入ポート16とPCR反応チャンバーセクション22に連絡されたメソスケールのフロー・チャンネル20が形成された本発明の装置の模式的断面図である。

図5は、図4の装置の斜視図である。

図6Aは、それを示すために用いることができ、その中の反応チャンバーセクション22の温度を制御するための加熱要素57を含む、器具50内に収容された分析装置10の模式図である。

図6Bは、それを示すために用いることができ、その中の反応チャンバーセクション22Aの温度を制御するための加熱要素57を含む、器具50内に収容された分析装置10の模式図である。

図7は、基板上に対称的に設けられた、フロー・チャンネルのフラクタル分岐システム40からなる抽出チャンバーと液体運送したメソスケールのPCRチャンバーセクション22Aと22Bを兼ね加工した当該基材14の模式的平面図である。

図8は、チャンネルの壁から延びた、核酸または断片を透過する突出物80を備えた基材14中のフロー・チャンネル20の断面斜視図である。

図9は、チャンネルの壁から延びた、核酸を透過する突出物90を備えた基材

14中のフロー・チャンネル20の断面図視図である。

図10は、シリコン基材14中に埋設加工したPCRチャンパーセクション22Aと22Bを含むメソスケールのPCR分析装置の模式的平面図である。

図11は、シリコン基材14中に埋設加工したPCRチャンパー22Aを含むもう一つのメソスケールのPCR分析装置の模式的平面図である。

図12は、細胞の分別、細胞の溶解およびPCR分析を含む種々の機能を果たすのに適した一連のメソスケールのチャンパーを加工した分析装置の模式的平面図である。

図13はフラクタル分岐フロー・チャンネル40の一対を加工した分析装置の模式的平面図である。

図14、15および16は分析装置10中のフロー・チャンネル20中に埋設加工したメソスケールのフィルタ24の異なる具象例の計測の断面図を示す。

図17は、装置10の内容物をろ過するために装置10と組み合わせて用いられる装置60の模式的断面図である。

図18は、図17の装置60の模式的断面図である。

各図面中の同様の参照符号は対応する部分を示す。

#### 技術的効果

本発明は、液体試料中のポリヌクレオチドの迅速な増幅を可能にするポリヌクレオチド重合反応を促進するための小さく、大量生産できる、典型的には一回使用の一連の装置を提供する。本装置は、数ミクロメートルの厚さで約0.2ないし2.0センチメートル平方のような大きさであって、試料の注入ポートとメソスケールのフロー・システムを形成するように埋設加工された基材よりなる。メソスケールのフロー・システムは、注入ポートから伸びる少なくとも一つの試料フロー・チャンネル、およびフロー・チャンネルと液体連絡した少なくとも一つのポリヌクレオチド重合反応チャンパーを含む。チャンネル、チャンパー、および他のポートを配置することにより、試料および試薬の連続的で、適度で、かつ正確な正確な流量内への添加を容易とする。反応チャンパーおよびフロー・チャンネルは、好ましくは、メソスケールの寸法、即ち、断面の寸法が0.1μmな

いし500μmである。反応チャンパーの好ましい寸法は0.7ないし100μmであり、好ましい幅は2.0ないし300μmである。好ましいフロー・チャンネルの寸法は0.1ないし100μm、好ましい幅は2.0ないし200μmである。

一つの具象例において、本装置は反応チャンパー(PCRチャンパー)中でポリメラーゼ反応(PCR)を促進するために利用することができ、PCRチャンパーには、試料ポリヌクレオチド、タッグ(Tag)ポリヌクレオチド、ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、試料ポリヌクレオチドとハイブリダイズ可能な一基のプライマー、ポリヌクレオチドに特異的な配列とハイブリダイズ可能な二基のプライマー(ここに一基目と二基目のプライマーは重合する生成物ポリヌクレオチドの両末端を定義する)を含むポリメラーゼ増幅に必要なPCR用試薬を供給することができる。ポリメラーゼ増幅反応は、当該分野で確立された方法(マニヤチス(Maniatis)ら、モレキュラー・クロニング(Molecular Cloning):ア・ラボラトリー・マニュアル(A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年)により実施できる。本装置には、各サイクルにおいて、温度を制御して二種ポリヌクレオチドを脱ハイブリダイズさせて、一本種ポリヌクレオチドを増幅、次いで、プライマーをアニーシングし、ポリヌクレオチドの重合を促すようにチャンパーの内容物の温度を段階的に変化させるための手段を包含させることができる。それに加え、制御部室/DNAポリメラーゼシステムによる高温のDNAのインビトロ増幅を含めた当該分野で公知の他のポリヌクレオチド重合反応も使用することもできる。ウォルカー(Walker)ら、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) U. S. A., 第89巻:第392頁-第396頁(1992年)、リガゼ増幅もまた使用できる。ベックマン・ケイ(Beckmann, K)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.), 第38巻:第457頁-第458頁。

一つの具象例において、本装置には、増幅したポリヌクレオチドを抽出する手段を包含することもできる。本装置は、細胞中または培養中のポリヌクレオチド

の分析を含めた、種々の自動化された、高度良好で迅速なポリヌクレオチドの分析を実施するために使用することができる。分析の終わりに、装置を一時的には捨て、使用後の装置の使用により、試料間のコンタミネーションが排除される。試料および反応生成物は真に露ったままに廃棄でき、小容量により廃棄物の処理が単純化される。

メソスケールのフロー・チャンネルおよび反応チャンパーを持つ分析装置は、既述基材から加工することができ、大量に加工できる。これらは容易に滅菌できる。シリコンは、よく発達した技術によりその正確で機械的な加工が可能であるので好ましいが、ポリテトラフルオロエチレンを含むポリマーのごとき他の材料も使用できる。試料の注入その他のポート、試料のフロー・チャンネル、反応チャンパー、もしくは他の機械的要素を含むメソスケールのフロー・システムは、かくして、装置者に公知の種々の最小機械加工方法のいずれによっても大量に、費用をかけてシリコン基材から加工できる。使用可能な最小機械加工の方法はスピンドル・フィニングおよび化学研磨、レーザー加工、またはUV加工、X線のプロセスのごとき等厚平面研磨、あるいは、湿式化学プロセスもしくはプラズマプロセスのいずれかによりなされるエッチングの方法といったフォム新出方法を含む。(例えば、マンツ(Mantz)ら、アナリチカル・ケミストリー(Trends in Analytical Chemistry), 第10巻:第144頁-第149頁(1991年)参照)。

真化する端と端のフロー・チャンネルはメソスケールの寸法で加工できる。加工されたメソスケールのフロー・チャンネルを含むシリコン基材はアノードに結合された薄いガラスのカバーで覆い、密封することができる。他の透明な、あるいは不透明なカバー材料も使用できる。別態として、二層のシリコン基材をサンドイッチとし、または一層のシリコン基材を2枚のガラスカバーの中にはきみこむことができる。透明なカバーを用いることにより、メソスケールのフロー・システム中の内容物を動的に観測することが容易になる。他の加工へのアプローチも用いることができる。

一つの具象例において、PCR分析が本装置の反応チャンパー中で実施でき

る。図1および図2中に模式的に示すごとく、装置10には、注入ポート16、メソスケールのフロー・チャンネル20、およびPCRチャンパー22を埋設加工したシリコン基材14を包含させることができる。重合反応に必要なポリヌクレオチドまたは試薬は、フロー・チャンネル20のいずれかの位置に加工された注入ポート16を通り、フロー・チャンネル20および反応チャンパー22を通って加えられ、生成物は(もし必要なら)取り出される。基材14はガラスまたはプラスチックのカバーシートの12により覆われる。分析の間中、装置10は図3Aに模式的に示された器具50のごとき器具と組み合わせて用いることができる。器具50はフロー・ライン55をその中に備えており、装置10を保持するための、そして、例えば、装置10上のポート16のようなポートと対合させるための、収容部位58を含む。器具50中のポンプ52は、試料および/または試薬を注入ポート16を介し本器具内のフロー・ライン55から反応チャンパー22まで輸送するのに用いられる。

器具50には、例えば、電気的加熱要素および/または冷却コイルのような、PCRチャンパー中の温度を制御するための加熱/冷却要素57を包含させることができる。電気的加熱要素を、別態として、反応チャンパー22の下方の器具中のマッピング電気接点に対して対合する電気的接点と共に、基材10中に組み込むこともできる。別態として、図3Bに示すごとく、本器具には、装置10中の反応チャンパーの上方に設置された、レーザーまたは他の電気エネルギーのごとき加熱手段53を包含させることができる。別態として、レーザーは反応チャンパーの下方の器具内に設けることもできる。器具中のマイクロプロセッサはハイブリッド環境に適した温度、例えば94℃とアニーリングおよび重合に適した温度、例えば65℃との間のPCRチャンパー中の温度サイクルを供給するための加熱要素を制御するために用いることができる。マイクロプロセッサが反応チャンパー中の温度サイクルを抽出し監視するために、器具と電気的に接触させて、基材中に熱電対を設けることもできる。小型の熱電対によるヒートポンプ(マテリアルズ・エレクトロニクス・プロダクツ・コーポレーション(Baterials Electric Products Corporation)、トレトン(Tretton)、ニュージャージー(New

Jersey)のごとき液体試料もまた反応チャンバーの温度を調節するために器具中に盛めることができる。もう一つの具体例において、図3B中に示される器具50中で、PCRサイクルのため管理される温度に試料を連続的に加熱し冷却するために、ガラスカバー12を通しての反応チャンバーに向けた時間を定めたレーザパルスにより反応チャンバーの温度を制御することができる。シリコンの熱伝導性により、迅速な加熱および冷却のサイクルが可能となる。

分析装置は、当該装置内のメソスケール・チャンネルの内容物を見るための器具と組み合わせて用いることもできる。一つの具体例における本器具は、装置内のメソスケールのチャンネルの内容物を見るための顕微鏡よりなるものであってもよい。もう一つの具体例において、図17および18に模式的に示した器具60内で図示したごとく、カメラを器具内に含めることもできる。器具60には、ハウジング62、映るためのスクリーン、およびチップを本器具中に挿入するためのスロット66を設ける。図17の断面図に示されるように、器具60には、ビデオカメラ68、光学的70、および、装置10を保持し、かつ装置10の位置と角度を手動で調節できるようにするための螺旋調整装置72をも含ませることができる。光学的70には、光源だけでなくチャンネルの内容物を拡大するためのレンズ系を含ませることもできる。ビデオカメラ68およびスクリーン64により、重合したポリヌクレオチドの存在によって引き起こされる、液の特性または色の変化のごとき試料液体の特性の変化が視覚的に監視され、また、所望により該器具を用いて記録することが可能となる。

もう一つの具体例において、図4、5および6Aに模式的に示すごとく、メソスケールのPCRチャンパーには、複数のセクション、例えば、フロー・チャンネル20Bにより連絡された2番のセクション22Aとセクション22Bを形成加工することができる。この具体例において、セクション22Aをハイブリッド状態に適した温度に加熱し、セクション22Bを、アニーリングおよび重合に適した温度に加熱する。分析の間、装置10は器具50の中に置くことができる(図6A)。器具50には、反応チャンパー・セクションの温度を制御するための手段57を設ける。別添として、これらのセクションを加熱するためにレーザを使

用することもできる。反応チャンパー中のこれらのセクションの温度を監視するために基材中に電極を含め、その出力をマイクロプロセッサの助けを借りて温度の入力を制御するために用いることができる。操作にあたり、器具中のポンプ52は、ポリヌクレオチド試料を輸送し、また必要とされるPCR試薬を注入ポート16Aを通しセクション22Aまで輸送するために用いられる。器具中のマイクロプロセッサによっても制御できるポンプ52は、次に、連続的なポリヌクレオチド反応を実施するために試料をチャンネル20Bを通してセクション22Aとセクション22Bの間を連続的に循環させるために使用され、ここにポート16Bはベントとして供される。反応の完了時には、器具50中のポンプ52は生成物を回収するため、器具中において試料をポート16Bとライン56を通してポート59に輸送するために使用することができる。もちろん、3番またはそれ以上のチャンパーを用いることもでき、そのあつは該々の反応を行うのに適した速度に維持される。

もう一つの具体例において、図4、5および6B中に示される装置10では、二本鎖DNAのハイブリッド状態に適した温度、例えば、94℃にセクション22Aを加熱するために加熱管が用いられ、一方セクション22Bとチャンネル20Bは、セクション22A、セクション22Bと連絡しているが、加熱された試料の、セクション22Aからセクション22Bまでの輸送の際に、試料の温度が、試料がさらなる循環のためにセクション22Aに戻る前に、その温度がアニーリングおよび重合に必要とされる温度まで下がるように熱を効率的に放散させることができるように、セクション22Aから一定の間隔において配置される。これは、シリコンが比較的高い熱伝導率を有し、液体試料と基材との界面の接触が非常に高いことにより容易に達成することができる。この具体例において、器具50内のマイクロプロセッサは、セクション22Aと22Bの間の試料の流れのサイクルを調節するポンプ52を制御するために用いることができる。それゆえ、動的平衡によってチャンパー間の流れに合った温度配分がつくられ、双方において等しい加熱率を用いることにより適切な温度が達成される。他の設計も可能である。例えば、アニーリングおよび重合反応は、異なる最適温度

に設定した一面のPCRチャンパー中の異なるセクションで行なうことができる。

ポリヌクレオチド反応は、タック(Taq)ポリヌクレオチドのごときいずれの熱不安定ポリヌクレオチド・ポリヌクレオチドを用いても実施することができる。タック(Taq)ポリヌクレオチドのごとき試薬は試料に添加され、次に、メソスケールの反応チャンパーへの注入ポートを通して輸送されるか、あるいは該試薬は試料とは別に、別々の注入ポートを通して反応チャンパー中に輸送される。

本装置の容量は非常に小さく、それゆえ一回の分析に必要な試料液体の量は非常に少ない。例えば、その表面に幅10ミクロン×深さ10ミクロン×長さ1cm(10ミクロン)の500の溝が彫刻されている1cm×1cmのシリコンの基材において、各溝の体積は10<sup>-10</sup>μlであって、500の溝の全体積は0.5μlである。メソスケールのフロー・システムの体積が小さいことにより、液体試料の非常に小さい量(＜5μl)で分析が可能となる。本装置のメソスケールのフロー・システムはマイクロリットルの体積にて形成加工されるかまたは、別添としてナノリットルの体積もしくはそれより少ない体積にて形成加工され、このことにより一回の分析に必要とされる試料および/または試薬の液体の量を更に縮減する。

本発明の装置は生物学的な液体試料においてポリヌクレオチドの迅速な増幅のために用いられるメソスケールのポリヌクレオチド重合反応チャンパーを特徴とする。本装置は増幅したポリヌクレオチド生成物を検出するための基材中あるいは器具中にある手段をも含む。装置中における増幅したポリヌクレオチド生成物の存在はメソスケールのフロー・システム中の反応チャンパーに入るおよび/または存在する試料液体の圧力もしくは電気伝導率を監視することを意味する多くの方法のいずれによっても検出可能である。増幅されたポリヌクレオチド生成物の存在は、ラベルされたオリゴヌクレオチドまたは抗体プローブのごときラベルされたプローブによる免疫アッセイ、もしくは電気化学的検出によっても検出できる。

一つの具体例において、増幅したポリヌクレオチド生成物は基材中であって反応チャンパーと液体を連絡したメソスケールのフロー・システム中に加工された

抽出チャンパーを用いて検出可能である。抽出チャンパーには増幅されたポリヌクレオチドと結合可能な結合部位を設ける。結合部位は、例えば、ポリヌクレオチドまたは抗体プローブからなるものとする。抽出チャンパーは、J. S. リン・アレン・バー(代理人明細書 No. UPA 001 (8261/2))、メソスケール・ディテクション・ストラクチャーズ (Mesoscale Detection Structures) に開示されている方法により加工でき、その開示を引用により本明細書の一部分とみなす。本装置は分析中に得られるデータを検出し記録するマイクロプロセッサを含む器具と組み合わせて用いることができる。

一つの具体例において、メソスケールの抽出チャンパーには、重合したポリヌクレオチド生成物の存在下において、検出可能なビーズの配置を引き起こすために、重合したポリヌクレオチドに結合することのできる不活性粒子、例えば、ビーズあるいは他の粒子を設けることができる。粒子により誘導される配置は、液体のごとき結合部位の粒子への付着により促進される。

重合したポリヌクレオチドに結合可能な液体あるいは他の液体結合部位は、結合を誘導するために抽出チャンパーに導入されるか、あるいは化学的もしくは物理的により誘導されるかにより抽出チャンパーの表面に配置されるか、あるいは別添として、抽出領域の不活性粒子の表面に配置されるか、ポリヌクレオチドが陽性であるかどうかの試験が行える。シリコンの表面の化学的活性化特性は、特にクオマトグラフィーの方面においてよく発達している。(例えば、ソッド・フェス・バイオケミストリー(Solid Phase Biochemistry)、ダブリュー・エイチ・スコウテン(J. H. Scouten)著、ジョン・ウィリー(John Wiley)、ニューヨーク、第535頁～第597頁(1983年)におけるハラー(Haller)の実験;およびマンデニウス(Mandenius)らの、アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)、第170巻:第68頁～第72頁(1988年)参照)。一つの具体例において、結合部位は抗体からなり、当該分析において公知のイムノアッセイの技術を検出領域において実施することができる。(ボルトン(Bolton) of Experimental Immunology)、ピア・ディ・エム(Pier, D.)著、ブラックウェル・サイエンティ

フィッシャー・パブリケーションズ(Blackwell Scientific Publications)、オックスフォード(Oxford)、1986年、第1巻、第26章をイムノアッセイの一般的議論のために引用された)。

光分子または光電子のごとき光学的に検出できる状態を該結合部位に結合させて、置かれたポリヌクレオチドの抽出を向上させることもできる。別座として、光光検出状態のごとき二次検出物質を、該流動システムを通してデリバリーして、該抽出領域中の結合したポリヌクレオチド/結合部位に結合させて、分析物の存在の指標となる光学的に検出可能な部分を含む「サンドウィッチ」を形成させることもできる。該抽出領域における増幅されたポリヌクレオチドの結合は、該抽出領域にわたり配された透明窓を通して、例えば、光学的に、複眼的または機械的に検出することができる。一の具体例において、増幅されたポリヌクレオチドの生成は、異化エチジウムのごく少量の添加により検出することができ、これは二重陰イオンポリヌクレオチドの検出を示す(ヒグチ(Higuchi)ら、バイオテクノロジー(Biotechnology)、第10巻:第413頁(1992年))。

また、増幅されたポリヌクレオチドの1方の端に結合した増幅した増幅したポリヌクレオチド鎖、例えば、ビーズ上に固定化させた抽出ポリヌクレオチドを該抽出領域に配してもよく、ビーズ回収の手段により、置かれたポリヌクレオチド生成物を検出できる。当該分野で公知のポリヌクレオチド・ハイブリダイゼーション技術を利用することができる(マニティス(Manitis)ら、モレキュラー・クロニング:ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning: Laboratory Manual)、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・プレス(Cold Spring Harbor Press)、1989年);ベナー(Vener)ら、アナリティカル・ケミストリー(Anal. Chem.)、第19巻:第308〜第311頁(1991年)。ポリヌクレオチドプローブを、例えば、サブミクロンのラックシステムに、結合させることもできる(ウルフ(Wolf)ら、ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Research)、第15巻:第2911〜第2926頁(1987

年))。

また、(出願明細書に本明細書の一部とみなす)USSN(代理人ファイル番号U PA 002(8261/3))、アナリシス・ベースド・オン・フロー・レストリクション(Analysis Based on Flow Restriction)に開示されているように、該反応チャンパーで生成させた置換ポリヌクレオチドの存在により引き起こされる流動制御に敏感な抽出領域を用いてポリヌクレオチド置換を検出することもできる。また、増幅されたポリヌクレオチドの存在は、該流動システムを出入りする液体試料の圧力または電気的導電性を検出することによっても検出することができる。該導電性は、例えば、該基材を通して検出領域と組み合わせて用いる器具の電気接触面と接触する電気接触面を用いて測定することができる。電気接触面は、公知の電気配管技術により加工できる(ファンダメンタルズ・オブ・アプリケーションズ・オブ・ケミカル・センサーズ(Fundamentals and Applications of Chemical Sensors)、ディー・シュワツェル(D. Schuetzle)およびアール・ハメル(R. Hamerle)編、エイシーエス・シンポジウム・シリーズ309(ACS Symposium Series 309、ワシントン、ディシー(Washington, DC)中のゼーメル(Zemel)ら、1986年、第2章参照)。

該反応チャンパー中の増幅されたポリヌクレオチドは、該試料液体の圧力をセンサすることにより検出できる。例えば、図6Aに模式的に図示する、器具50に収容された装置10においては、ポート16を通して該メソスケール流動システムを出入りする試料液体に連通した圧力検出器54により、置かれた生成物および生成した目録の存在または流動制御により引き起こされる圧力の下降を検出することができよう。また、メソスケール圧力センサーを直接シリコン基板上に加工してもよい(アンゲル(Angell)ら、サイエンティフィック・アメリカン(Scientific American)、第248巻:第44〜第55頁(1983年))。

流動制御に敏感で、例えば、連続した流動チャンネルを分岐させる形状の「フラクタル(fractal)」形状で構成されているメソスケール流動システムを用いることにより、ポリヌクレオチド置換を検出できる。該フラクタル分枝チャン

ネルは、一連の狭い流動チャンネルを供する各々の分岐点で、面積が小さくなるシリコン基板上に加工してもよい。図7は、チャンネル20を介してポート16に連通した流動チャンネルのフラクタル分枝システム40、ならびに、部分22Aおよび22BよりなるPCR反応チャンパーを加工した基材14の部分的な平面図である。該基材中の増幅されたポリヌクレオチド生成物の存在は、該フラクタル中における流動特性に影響するであろう。この具体例における該チャンネル40は、対称に配されており、該フラクタルの中心に向かって連続して狭くなる道筋を有する。このフラクタルを通る流動は、置かれた生成物の存在により引き起こされる液体粘度の変化に敏感である。別座として、図13に図示するごとく、さらに複雑なフラクタル流動システムを利用することもできる。図13は一方のフラクタル分枝流動チャンネル40Aおよび40Bを図示する。該フラクタル流動チャンネル40Aは、該フラクタルの中心に向かって連続して狭くなる流動チャンネルで構成されており、その結果、流動制御に対する感受性が向上している。

該フラクタル領域中の流動制御は、該抽出領域にわたる透明カバーを通して、例えば、光学的に、検出することができる。別座として、1またはそれを超える圧力センサーを利用して、該フラクタル管路の中またはそれを超える増幅されたポリヌクレオチドの存在により引き起こされる液体粘度の変化に敏感する圧力変化を検出してもよい。また、ポリヌクレオチド生成物の導電性の変化も、該流動領域に置かる電気的な電気センサーを通して容易に検出できる。例えば、流入ポート16Aから抽出ポート16Bへの流動が遮断する該フラクタル領域40の目録は、過剰の導電性グループ17により検出できる。該グループの出力は、外周流動チャンネルにおける水性液体の存在または不在の指標である。抽出した液体またはポリヌクレオチドグループのごとき結合部位は、フラクタル領域中に、例えば、固定化するか、あるいは、ビーズのごとき固相反応物の上に固定させてもよく、生成ポリヌクレオチドに結合して該フラクタル管路中の流動制御を調整する。

一の具体例において、該メソスケール流動システムは、下流のポリヌクレオチ

ド分析の準備として、試料からの細胞を溶解するためのチャンパーを含有する。また、該装置は、異相細胞集団中の特定の細胞型を分離するために適用される原理を含有してもよい。該細胞分離原理は、該基材の構造上に固定化させた固定化結合部位を含有し、これはタンパク質のごとき特異的な細胞表面分子を介して標的細胞に選択的に可逆的に結合する。該試料中の他の細胞は下流へ通過し、排水浴または抽出ポートを通して排出する。例えば、緩衝液の流動で、流動を駆けて該細胞を溶解する。高流速および高圧では、該溶解した細胞は表面から剥ぎ取られて、分離領域から放出され、下流の溶解手段へ移動され、該手段において、細胞内のRNAまたはDNA分子のPCR分析の前に該細胞が溶解される。

該細胞溶解手段は、典型的には、該細胞分離領域および該ポリヌクレオチド置換反応チャンパーの間の管路に配されて、細胞内ポリヌクレオチドの分析の前に該細胞を溶解する。図9に図示するように、該細胞溶解手段は、流動チャンネル20の表面から伸びる細管路を貫通する突起物90よりなるものとすることができる。該貫通する突起物90を通して液体流動を押し込むと細胞が破壊される。もう一つの具体例において、該細胞溶解は、単純に十分な流動圧の適用で細胞を溶解する、制御された所定位置の領域よりなっている。該細胞溶解手段は、メソスケール溶解チャンパーに隣接された微細なシリコンピンよりなっている。ポンプのごとき、該細胞を含有する試料を該細胞溶解手段へ押し込むための手段を含有する器具は、十分な流動圧の適用で細胞を溶解し、吸いて流動システムを通して該試料を該反応チャンパーへデリバリーする。もう一つの具体例において、該細胞溶解手段は、細胞溶解剤を含有している。当該分野で公知の細胞溶解剤を利用することができる。

該反応チャンパーに液体を通じた該基材中の埋入した流入ポートから、剤を該反応チャンパーに添加してもよい。シリコン基板上の該流動チャンネルに微細加工されたフルーグを用いて、ポリヌクレオチド分析の前に細胞溶解剤を通過させることができる。一の具体例において、図14、15および16に示すように、装置10の該ポート24は、チャンネル20に比して減少した直径のメソスケール

ール運動チャンネルよりなっている。操作において、該料はフィルター24を通過して反運動チャンネル20Aに流動する。次いで、該運動媒がフィルター24から閉止されて、チャンネル20Bを通過して流動する。該フィルター24が、0~1ないし20  $\mu\text{m}$ の単位の間おきとびで増加工えられる一方、流動チャンネル20AおよびBは、約500  $\mu\text{m}$ の単位の最大値および幅を有する。また、図3に示すように、流動チャンネル20の端面は、PCR分析チャンパーから突出し、大きさに応じて距離を分離するための細胞および(cell sieve)を構成する突出物80も有している。典型的には、底面下面に、該細胞料を該流動チャンネルを通して流動させると、該突出物80の間を通るのに十分に小さな細胞のみが該装置要素(functional element)にたどり着く。従って、これらの細胞は、細胞分解媒を通過して、次いで、分析用のPCR反応チャンパーにデリバリーされる。

もう一つの具体例において、無活性または無活性のピーズを該ポリメチルシロキサンシステムに配して、例えば、該系のような、外部的増強によるポリメチルシロキサンに比べて動かすことができる。該ピーズを用いて該システムの機械的変形に該系を移動することができるが、あるいは、該系、該系または反応混合物を熱を施すこともできる。一の具体例において、ポリメチルシロキサンを該反応ピーズ上に固定させても、該ピーズが該増強させたポリメチルシロキサンに結合できるようにしてもよい。ポリメチルシロキサンプロローのコーティングよりなる反応ピーズは、アッセイの終了時に、該メチルシロキサンを通して該反応チャンバーに移動させて、該系させたポリメチルシロキサンに該系に結合させてもよい。次いで、結合した該ポリメチルシロキサンを無活性ピーズ上に、該流動システムの抽出チャンバに移動させる。あるいは、該系ピーズへ移動させるてもよい。

図10に図示した本発明の一の実施例は、波路20Bで導かれたセクション22Aおよび22BよりなるメソスケールPCRチップが熱加工された基板14よりなる装置10である。該PCRチップ10は、該チップを支持するための凹部を包含する図6Aに示す器具50のごとき、器具と組み合わせて用

動させて反応生成物をPCRチャンパーセクション22Aおよび22Bから、例えば、ビーズ92に固定化させた増幅されたセンスおよび/またはアンチセンス鎖に相補的ポリヌクレオチドを含む検出チャンパー22Cにデリバリーする。重合生成物の、例えば、該出芽鎖に付加した透明カーパーを通して、ビーズ92の引当を監視することにより検算に配した。

もう一つの器具例を図11に図示する。この装置の機能、測定および操作は、第一のPCR反応チャンパー22Aよりなることを除き、図10に示したものと同一である。該装置は、図3Aに示した器具50のごとき器具と組み合わせて用いる。該装置は、粘結に要する温度およびアニーリングまたは重合に要する温度のいずれかに、反応チャンパー22Aを加熱および冷却するための手段を含有す。

操作においては、該器具を用いて、PCRに要するポリメラーゼおよび塩基を反応ポートを通して反応ポート2Aに供給する。次いで、該器具に接続したパイプを用いてポート16Aおよび16Bを閉める。1、6および16の2つのポートはまた再結合する。次いで、該器具中の加熱要素を利用して、狭いパイプライゼーション中に過熱温度と、アニーリングおよび重合に最適な温度との間に該反応チャンパーを通過させる。該PCR反応は、完了すると、ポート16Cを閉め、ポート16Dを開けて該器具を、例えば、ヒート92上に固定化させた、ポリクワレオキドプローブを含有する該反応チャンバー2Bにリプレイスする。該ポリクワレオキドの特性は、該反応チャンパー中のポリクワレオキドプローブの組成によって与えられる。

の要請は、以下の図で示されない事象等からさらに理解されよう。

五、

図1に模式的に示した装置の中でポリマーゼ連鎖反応を行う。反応中のポリヌクレオチドを抽出するためにPCR分析を行うには、該核酸産物をクエーク・ポリマーゼ、ヌクレオチド三リン酸、ポリヌクレオチドプライマーおよび熱PCRに要する試薬の混合物に添加する。該反応試料産物を炭素ポット

いる。該器具50は設置10中でポート16A、16B、16Cおよび16Dに接続した成長52を駆動する。また、該器具は、該ポート16A、16B、16Cおよび16Dを配列的に開閉するバブルも含む。一の異性体として、該装置の流動システムを強制的に満たしたまま維持し、該器具中、または附近として、該装置中のバブルを利用して流体流動を促す。該PCRチャンバーのセクション22および22Bを94度および65度にしたが加熱し、PCRに必要な融解速度およびアニリング速度にする。前述で述べたように、反応チャンバーセクションは、該セクションの下に基質中に組み込まれた電気発熱部的手段により加熱してもよく、該セクションは該器具中の電気発熱部と連通することである。附近として、光学的リーダーを用いて、支持体に取り付けられているガラスカバーを通して、該反応チャンバー部分を加熱してもよい。加熱セッサーを、該器具の電気発熱部中の該基質中に設けてもよい。該器具中のマイクロプロセッサを用いて、該反応チャンバーセクションの温度、ならびに該流動システム中の流体の流動を制御することができる。

最初に、該チャンネルおよび緩衝液を満たしたチャンバーの操作において、ポート16Aおよび16Cを開ける一方で16Bおよび16Dを開閉する。該装置中のポンプ32は、該試料液体、ならびに、所望により、タック・ポリマーゼ、プライマーおよびヌクレオチド三リン酸のこの系PCに要する試薬を、ポート16Aを介して、フィルター24を通して反応チャンバーセクション22Aにデリバリーする。ないで、ポート16Aを開閉。16Bを開け、該装置中の該ポンプ32を閉じて、ポリヌクレオチド酸ハイブリダイゼーション(dehybridization)を経こすセクション22Aと、Aニージングおよび量反応を記すセクション22Bとの間に流液チャンバー20Dを通して液体流動を相互調整させる。ポート16Cを開ければ、該システムを排出でき、また、所望により、タック・ポリマーゼ、ヌクレオチド三リン酸、プライマーおよび他の試薬をデリバリーすることもある。例えば、30ないし35連続して該ポリマーゼを調製反応が完了した。ポート16Cを閉め、ポート16Dを開けて、該装置中のポンプを作

16Aを通して区画を介して、PCR反応チャンパー22Aにデリバリーする。区画中に含まれる各バルブ手段によりポート16Aおよび16Dを閉じ一方、ポート16Bおよび16Cを開ける。区画内のマイクロプロセスおよび基質制御装置を用いて、反応チャンパー22Aにて、ポリヌクレオチド説ハイブリダイゼーションのための94℃でポリヌクレオチド反応のための65℃の間に温度管理をする。該ポリヌクレオチド反応が完了した後に、ポート16Cを閉め、16Dを開けて、ポート16Bに導流した区画中のポリヌクレオチドを用いて、該PCRチャンパー22Aからの区画を流動化チャンネル20Bを通して区画出チャンプ22Bにデリバリーする。区画22Bを含有する流出チャンプ22Bは、増幅させたポリヌクレオチドに種々異なる基面に固定化された種々なポリヌクレオチドである。増幅させたポリヌクレオチドおよび種々のポリヌクレオチドの間のハイブリダイゼーション反応により形成されるビーズの凝集は、区画出領域22Bにわたって配された窓を通して観察し、増幅させたポリヌクレオチド生成物の存在テストを提供する。

五、問題 2

図12は、生物活性試験混合液中の脂質系成分から抽出を単純するのにも異い、次いで、特定のタクロポド配列のアマイを行うために用いる重箱14を含有する重箱10を模式的に示す。重箱10上に脱脂加工された、あるいは、乾燥分相テンパー22A、脂質系成分22B、フルクトース24、糖24、糖22Cおよび22DよりなるPCR反応チャンパー、ならびにフラクタル抽出媒40を含有するメソスケール反応20である。また、該メソスケール反応システムには、液体投入/排出ポート16A、16B、16Cおよび16Dが配されている。該装置は、図6Aに示す器具50のごとき装置と組み合わせて用

最初に、圧着具中のバルブを開いてポート16Cおよび16Dを開める一方、ポート16Aおよび16Bを開ける。固形炭化物を含有する試料を、圧着具中のポンプ52により試料インレット口16Aに向け、メソスケール流路20を通し

は図示の断面に定置したごとく、本発明の一部と考えられよう。

で分離チャンバー22Aに流動させる。チャンバー22Aは、該チャンバーの壁に固定化した結合部位を有し、これは試料中の所望の細胞型上の表面分子に選択的に結合する。残りの細胞成分は、ポート16Bを介して基材の外に排出される。チャンバー22A中の所望の細胞集団に結合した後も緩衝液を流動させて洗浄し、該細胞集団の単離を確認する。次に、ポート16Bを閉じ16Cを開ける。次いで、流動を十分に増加させて固定化している細胞を剥ぎ取る。流動を続けて、チャンバー22B中の壁を貫通する突出物90を通して細胞を押し込み、細胞を破壊して細胞内物質を放出させる。

フィルター24の後に試料を流動させ続け、大きな細胞膜成分および他の実質物を、流動チャンネル20BによりPCRチャンバーセクション22Dに運搬したメソスケールPCRチャンバーセクション22Cに運搬する。次に、PCRアッセイに要するタック-ポリメラーゼ、プライマーおよび他の試薬を、該器具中の運搬したポートおよび流路からポート16Cを通してセクション22Dに添加すると、分離した細胞膜成分からの細胞内可溶性成分と該PCR試薬とが混合する。ポート16Aを閉じるとともに、ポート16Bを介して運搬した該器具中のポンプを用いて、PCR試料および試薬を各々94および65℃に設定したセクション22Cおよび22Dの間に流動チャンネル20Bを通して循環させ、複製のポリヌクレオチド増幅および重合の両面を行い、生成物ポリヌクレオチドを増幅させる。次に、該器具中のバルブを用いてポート16Cを閉じ、ポート16Dを開ける。次いで、ポート16Bに運搬した該器具中のポンプを用いて、細胞膜成分から単離した該増幅させたポリヌクレオチドを、流路40の一連のフラクタル分岐よりなる排出領域に向ける。該フラクタル領域40における流動制御は、増幅させたポリヌクレオチド生成物の存在の確率指標として配され、該排出領域にわたって配されたガラスカパーを通して先ず的に排出される。

前記の記載が図示の方法により記載されたもので、本発明が、本明細書中に記載した構造および方法の要図の範囲内の他の形態をとることは理解されよう。当業者なら変形および修飾を思い付くであろうし、かかる全ての変形および修飾

FIG.1

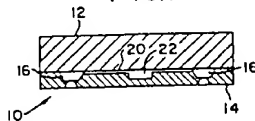


FIG.2

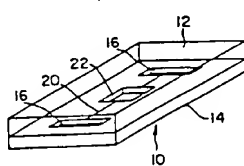


FIG.3A

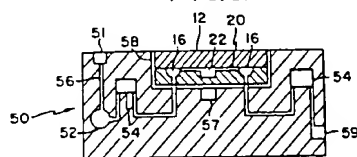


FIG.3B

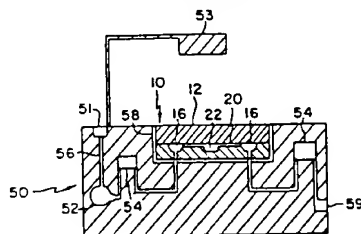


FIG. 4

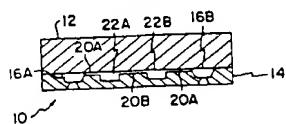


FIG. 5

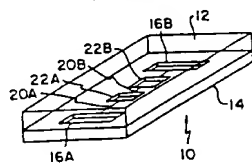


FIG. 7

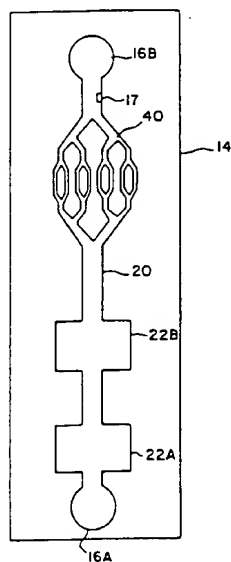


FIG. 6A

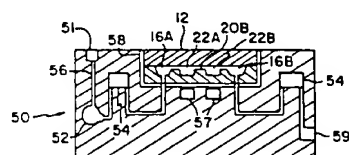


FIG. 6B

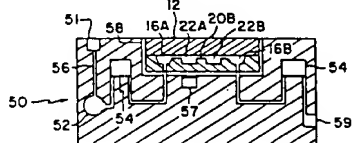


FIG. 8

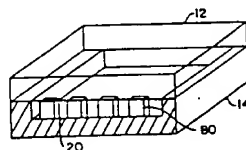


FIG. 9

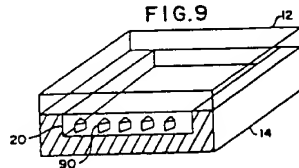


FIG. 12

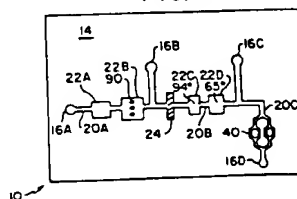


FIG.10

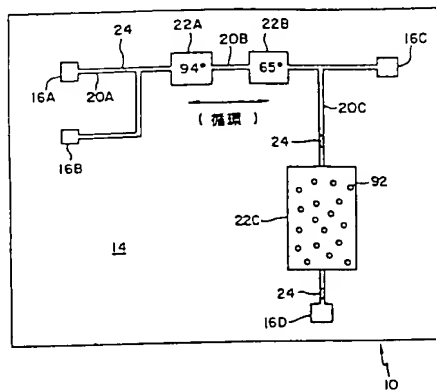


FIG.11

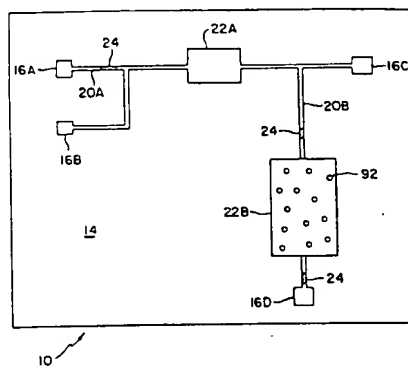


FIG. 13

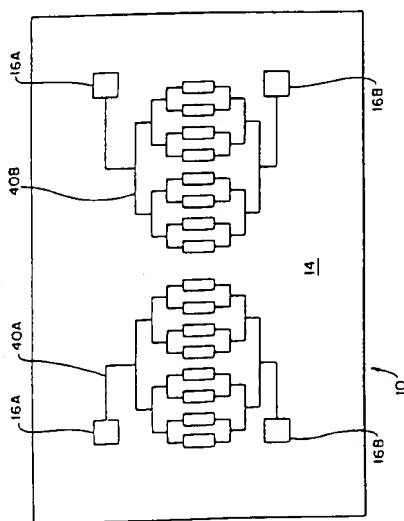


FIG. 14

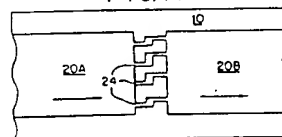


FIG. 15

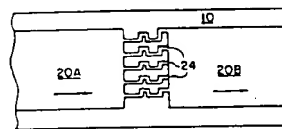


FIG. 16

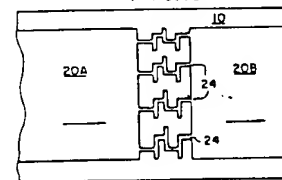


FIG. 18

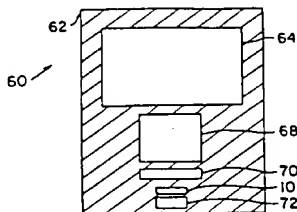
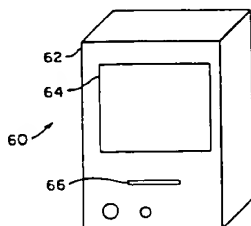


FIG.17



|   |          |                    |                         |
|---|----------|--------------------|-------------------------|
| CLASSIFICATION BY SUBJECT IN ACCORD WITH THE <i>International Patent Classification</i> (IPC)   |          |                    |                         |
| Principal Classification: <i>IPC</i> in the <i>International Classification of IPC</i>  |          |                    |                         |
| Int. Cl. 5  | B01L7/00 | B01L7/00           | C1201/68; B01L18/00     |
| A. INVENTOR (NAME AND ADDRESS)  |          |                    |                         |
| Inventor's Name   |          | Inventor's Address |                         |
| Inventor's Name   |          | Inventor's Address |                         |
| Int. Cl. 5 B01L   |          |                    |                         |
| The following Statement sets forth the substance of the invention:<br>It is to be taken into account that the following is a brief description of the invention.  |          |                    |                         |
| 1. INVENTION (SUBSTANCE OF THE INVENTION)<br>a. Summary of the Invention: The following is a brief description of the invention.  |          |                    |                         |
| FR.A.1 656 637 (S.C.R.A.S. SA)<br>8 February 1991   |          |                    | 1-3,<br>25-27,<br>33-34 |
| see page 5, line 25 - line 34<br>see page 6, line 13 - line 17; figure 1C<br>see page 7, line 9 - line 22   |          |                    |                         |
| WO.4.9 116 946 (PHARMACIA BIODIVERSITY AB)<br>14 December 1991  |          |                    | 1                       |
| see page 2, line 16 - line 25<br>see page 4, line 26 - line 32<br>see page 10, line 1 - line 8; figure 1  |          |                    |                         |
| EP.A. 6 401 995 (EASTMAN KODAK)<br>19 December 1990   |          |                    | 1                       |
| see column 4, line 13 - line 35; figures 1-6<br>see column 5, line 16 - line 33<br>see column 7, line 4 - line 8  |          |                    |                         |
| * Names of inventors of other countries: 1)<br>2)<br>3)<br>4)<br>5)<br>6)<br>7)<br>8)<br>9)<br>10)<br>11)<br>12)<br>13)<br>14)<br>15)<br>16)<br>17)<br>18)<br>19)<br>20)<br>21)<br>22)<br>23)<br>24)<br>25)<br>26)<br>27)<br>28)<br>29)<br>30)<br>31)<br>32)<br>33)<br>34)<br>35)<br>36)<br>37)<br>38)<br>39)<br>40)<br>41)<br>42)<br>43)<br>44)<br>45)<br>46)<br>47)<br>48)<br>49)<br>50)<br>51)<br>52)<br>53)<br>54)<br>55)<br>56)<br>57)<br>58)<br>59)<br>60)<br>61)<br>62)<br>63)<br>64)<br>65)<br>66)<br>67)<br>68)<br>69)<br>70)<br>71)<br>72)<br>73)<br>74)<br>75)<br>76)<br>77)<br>78)<br>79)<br>80)<br>81)<br>82)<br>83)<br>84)<br>85)<br>86)<br>87)<br>88)<br>89)<br>90)<br>91)<br>92)<br>93)<br>94)<br>95)<br>96)<br>97)<br>98)<br>99)<br>100)<br>101)<br>102)<br>103)<br>104)<br>105)<br>106)<br>107)<br>108)<br>109)<br>110)<br>111)<br>112)<br>113)<br>114)<br>115)<br>116)<br>117)<br>118)<br>119)<br>120)<br>121)<br>122)<br>123)<br>124)<br>125)<br>126)<br>127)<br>128)<br>129)<br>130)<br>131)<br>132)<br>133)<br>134)<br>135)<br>136)<br>137)<br>138)<br>139)<br>140)<br>141)<br>142)<br>143)<br>144)<br>145)<br>146)<br>147)<br>148)<br>149)<br>150)<br>151)<br>152)<br>153)<br>154)<br>155)<br>156)<br>157)<br>158)<br>159)<br>160)<br>161)<br>162)<br>163)<br>164)<br>165)<br>166)<br>167)<br>168)<br>169)<br>170)<br>171)<br>172)<br>173)<br>174)<br>175)<br>176)<br>177)<br>178)<br>179)<br>180)<br>181)<br>182)<br>183)<br>184)<br>185)<br>186)<br>187)<br>188)<br>189)<br>190)<br>191)<br>192)<br>193)<br>194)<br>195)<br>196)<br>197)<br>198)<br>199)<br>200)<br>201)<br>202)<br>203)<br>204)<br>205)<br>206)<br>207)<br>208)<br>209)<br>210)<br>211)<br>212)<br>213)<br>214)<br>215)<br>216)<br>217)<br>218)<br>219)<br>220)<br>221)<br>222)<br>223)<br>224)<br>225)<br>226)<br>227)<br>228)<br>229)<br>230)<br>231)<br>232)<br>233)<br>234)<br>235)<br>236)<br>237)<br>238)<br>239)<br>240)<br>241)<br>242)<br>243)<br>244)<br>245)<br>246)<br>247)<br>248)<br>249)<br>250)<br>251)<br>252)<br>253)<br>254)<br>255)<br>256)<br>257)<br>258)<br>259)<br>260)<br>261)<br>262)<br>263)<br>264)<br>265)<br>266)<br>267)<br>268)<br>269)<br>270)<br>271)<br>272)<br>273)<br>274)<br>275)<br>276)<br>277)<br>278)<br>279)<br>280)<br>281)<br>282)<br>283)<br>284)<br>285)<br>286)<br>287)<br>288)<br>289)<br>290)<br>291)<br>292)<br>293)<br>294)<br>295)<br>296)<br>297)<br>298)<br>299)<br>300)<br>301)<br>302)<br>303)<br>304)<br>305)<br>306)<br>307)<br>308)<br>309)<br>310)<br>311)<br>312)<br>313)<br>314)<br>315)<br>316)<br>317)<br>318)<br>319)<br>320)<br>321)<br>322)<br>323)<br>324)<br>325)<br>326)<br>327)<br>328)<br>329)<br>330)<br>331)<br>332)<br>333)<br>334)<br>335)<br>336)<br>337)<br>338)<br>339)<br>340)<br>341)<br>342)<br>343)<br>344)<br>345)<br>346)<br>347)<br>348)<br>349)<br>350)<br>351)<br>352)<br>353)<br>354)<br>355)<br>356)<br>357)<br>358)<br>359)<br>360)<br>361)<br>362)<br>363)<br>364)<br>365)<br>366)<br>367)<br>368)<br>369)<br>370)<br>371)<br>372)<br>373)<br> |          |                    |                         |

The source from the person directly responsible reporting in the person document used in the above-mentioned international search report.  
The document is an attachment to the European Patent Office (EPO) file.  
The European Patent Office is an EU body for patenting which are mostly given for the purpose of information. 03/09/93

| Formal document<br>date of issuance (month) | Processing<br>date | Protein family<br>abbreviation | Protein family<br>number |
|---|--------------------|--------------------------------|--------------------------|
| FS-A-2450457                                | 08-02-91           | ALP-A-                         | 6014890                  |
|   |                    | BE-A-                          | 1004524                  |
|   |                    | CE-A-                          | 481431                   |
|   |                    | DE-A-                          | 4624714                  |
|   |                    | GE-A-                          | 2238005                  |
|   |                    | JP-A-                          | 5083552                  |
|   |                    | LU-A-                          | 87782                    |
|   |                    | RL-A-                          | 9001772                  |
|   |                    | US-A-                          | 5176203                  |
| WD-A-8116966                                | 14-11-91           | EP-A-                          | 0527905                  |
|   |                    | SE-A-                          | 9001699                  |
| EP-A-0402995                                | 19-12-90           | CA-A-                          | 2014981                  |
|   |                    | CA-A-                          | 2614982                  |
|   |                    | EP-A-                          | 0402994                  |
|   |                    | JP-A-                          | 3618700                  |
|   |                    | JP-A-                          | 5089339                  |
|   |                    | US-A-                          | 5089233                  |
|   |                    |                                | 18-02-97                 |

## フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 877, 662  
(32) 優先日 1992年5月1日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(31) 優先権主張番号 877, 701  
(32) 優先日 1992年5月1日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 877, 702  
(32) 優先日 1992年5月1日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, PT, SE), AU, CA, JP